

日本国特許庁  
PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

Y. Takashima et al.  
3/29/00  
Q 58486  
1 of 1  
U.S. PTO  
09/537416  
03/29/00

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日

Date of Application:

1999年 4月 5日

出願番号

Application Number:

平成11年特許願第097570号

出願人

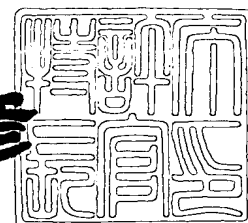
Applicant(s):

住友化学工業株式会社

2000年 3月 3日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

近藤隆彦



出証番号 出証特2000-3013665

【書類名】 特許願

【整理番号】 P150233

【提出日】 平成11年 4月 5日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12P 13/00

【発明の名称】 光学活性アミノ酸の製造方法

【請求項の数】 5

【発明者】

    【住所又は居所】 兵庫県宝塚市高司4丁目2番1号 住友化学工業株式会社  
社内

    【氏名】 高島 喜樹

【発明者】

    【住所又は居所】 兵庫県宝塚市高司4丁目2番1号 住友化学工業株式会社  
社内

    【氏名】 新田 英二

【発明者】

    【住所又は居所】 兵庫県宝塚市高司4丁目2番1号 住友化学工業株式会社  
社内

    【氏名】 小林 優子

【特許出願人】

    【識別番号】 000002093

    【氏名又は名称】 住友化学工業株式会社

【代理人】

    【識別番号】 100093285

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 久保山 隆

    【電話番号】 06-6220-3404

【選任した代理人】

    【識別番号】 100094477

【弁理士】

【氏名又は名称】 神野 直美

【電話番号】 06-6220-3404

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 010238

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9701007

【プルーフの要否】 要

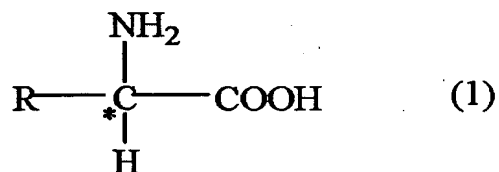
【書類名】 明細書

【発明の名称】 光学活性アミノ酸の製造方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

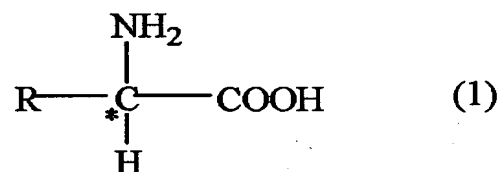
一般式 (1)



(式中、Rは置換されていてもよいC1-12アルキル基、置換されていてもよいC4-8シクロアルキル基または置換されていてもよいC6-14アリール基を表し、\*は不斉炭素原子を表す。)で示されるアミノ酸のD体に、該アミノ酸(1)のD体をL体に変換する能力を有する微生物を作用させることを特徴とするアミノ酸(1)のL体の製造方法。

【請求項 2】

一般式 (1)



(式中、Rは置換されていてもよいC1-12アルキル基、置換されていてもよいC4-8シクロアルキル基または置換されていてもよいC6-14アリール基を表し、\*は不斉炭素原子を表す。)で示されるアミノ酸のL体に、該アミノ酸(1)のL体をD体に変換する能力を有する微生物を作用させることを特徴とするアミノ酸(1)のD体の製造方法。

【請求項 3】

微生物が、アルスロバクター属、クリセオモナス属、フラビモナス属、クレブシエラ属、ノカルディア属、シュードモナス属、リゾビウム属、サッカロポリスボラ属またはストレプトミセス属に属する微生物である請求項1または2に記載の方法。

【請求項 4】

微生物が、アルスロバクター・パセンス (*Arthrobacter pascens*)、クリセオモナス・ルテオラ (*Chryseomonas luteola*)、フラビモナス・オリジハビタンス (*Flavimonas oryzihabitans*)、クレブシエラ・プランチコラ (*Klebsiella planticola*)、ノカルディア・ディアファノゾナリア (*Nocardia diaphanozonaria*)、シュードモナス・クロロラフィス (*Pseudomonas chlororaphis*)、シュードモナス・オレオボランス (*Pseudomonas oleovorans*)、シュードモナス・オキザラチカス (*Pseudomonas oxalaticus*)、シュードモナス・タエトロレンス (*Pseudomonas taetrolens*)、リゾビウム・メリロチ (*Rhizobium meliloti*)、サッカロポリスポラ・ヒルスタ (*Saccharopolyspora hirsuta*)、ストレプトミセス・ロセウス (*Streptomyces roseus*) に属する微生物である請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 5】

微生物が、アルスロバクター・パセンス (*Arthrobacter pascens*) IF012139 株、クリセオモナス・ルテオラ (*Chryseomonas luteola*) JCM3352 株、フラビモナス・オリジハビタンス (*Flavimonas oryzihabitans*) JCM2952 株、クレブシエラ・プランチコラ (*Klebsiella planticola*) JCM7251 株、ノカルディア・ディアファノゾナリア (*Nocardia diaphanozonaria*) JCM3208 株、シュードモナス・クロロラフィス (*Pseudomonas chlororaphis*) IF03521 株、シュードモナス・オレオボランス (*Pseudomonas oleovorans*) IF013583 株、シュードモナス・オキザラチカス (*Pseudomonas oxalaticus*) IF013593 株、シュードモナス・タエトロレンス (*Pseudomonas taetrolens*) IF03460 株、リゾビウム・メリロチ (*Rhizobium meliloti*) IF014782 株、サッカロポリスポラ・ヒルスタ (*Saccharopolyspora hirsuta* subsp. *kobensis*) JCM9109 株、ストレプトミセス・ロセウス (*Streptomyces roseus*) IF012818 株である請求項 1 または 2 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、光学活性アミノ酸の製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

光学活性アミノ酸類は、喘息薬、抗うつ薬または抗血栓薬等の医薬中間体、飼料添加物あるいは食品添加物等として有用な化合物であることが知られている。

光学活性アミノ酸類の製造方法として、生化学的手法を用いる方法は、一般に有機化学的方法に比し、操作の簡便性、収率、用いられる材料のコスト、目的物の光学純度等の点で有利とされており、中でも微生物を用いる方法は、目的物製造における微生物の触媒としての高い安定性や使用する微生物の調製の容易さ等の点で優れるとされている。

微生物を用いる光学活性アミノ酸類の製造方法としては、ラセミアミノ酸類の片方の光学異性体を分解する方法、ラセミアミノ酸類のアミノアシル体を光学選択的に脱アシル化する方法、アミノ供与体共存下にケト酸からL体アミノ酸を生成させる方法、微生物の醗酵生産能を利用する方法等が知られている。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】

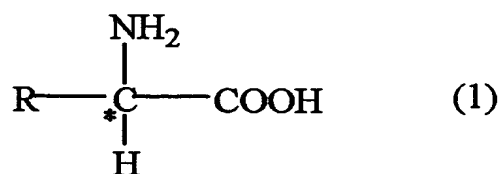
本発明の目的は、微生物を用いるより効率的な光学活性アミノ酸類の製造方法を提供することにある。

【0004】

【課題を解決するための手段】

このような状況下、本発明者らは鋭意検討した結果、アミノ酸類のカルボキシル基の隣の不斉炭素に基づく光学異性体の一方を他の異性体に変換する能力を有する微生物を見出すとともに、該微生物をアミノ酸類に適用することにより、一方の光学異性体のみに作用し、効率的に光学活性アミノ酸類が得られることを見出し本発明にいたった。

即ち本発明は、一般式(1)



(式中、Rは置換されていてもよいC1-12アルキル基、置換されていてもよいC4-8シクロアルキル基または置換されていてもよいC6-14アリール基

を表し、\*は不斉炭素原子を表す。)で示されるアミノ酸(以下、本アミノ酸(1)と記す。)のD体に、本アミノ酸(1)のD体をL体に変換する能力を有する微生物を作用させることを特徴とする本アミノ酸(1)のL体の製造方法、及び本アミノ酸(1)のL体に、本アミノ酸(1)のL体をD体に変換する能力を有する微生物を作用させることを特徴とする本アミノ酸(1)のD体の製造方法(以下、両者を総称して本発明方法と記す。)を提供するものである。

【0005】

【発明の実施の形態】

以下、本発明方法を詳細に説明する。

本発明において使用し得る微生物は、本アミノ酸(1)のカルボキシル基の隣の不斉炭素に基づく光学異性体の一方を他の異性体に変換する能力を有する微生物であり、具体的には本アミノ酸(1)のD体をL体に、またはL体をD体に変換する能力を有する微生物(以下、本微生物と記す。)である。

【0006】

本微生物としては、前記の能力を有していれば、例えば、自然界から分離された微生物の野生株であっても、該野生株から薬剤や紫外線等によって誘導された変異株であってもよい。

【0007】

本微生物の好適な例としては、例えば、アルスロバクター属、クリセオモナス属、フラビモナス属、クレブシエラ属、ノカルディア属、シュードモナス属、リゾビウム属、サッカロポリスポラ属またはストレプトミセス属に属する微生物株が挙げられ、好ましくは、アルスロバクター・パセンス (*Arthrobacter pascens*)、クリセオモナス・ルテオラ (*Chryseomonas luteola*)、フラビモナス・オリジハビタンス (*Flavimonas oryzihabitans*)、クレブシエラ・プランチコラ (*Klebsiella planticola*)、ノカルディア・ディアファノゾナリア (*Nocardia diaphanozonaria*)、シュードモナス・クロロラフィス (*Pseudomonas chlororaphis*)、シュードモナス・オレオボランス (*Pseudomonas oleovorans*)、シュードモナス・オキザラチカス (*Pseudomonas oxalaticus*)、シュードモナス・タエトロレンス (*Pseudomonas taetrolens*)、リゾビウム・メリロチ (*Rhizobium melilo*

ti)、サッカロポリスポラ・ヒルスタ (*Saccharopolyspora hirsuta*)、ストレプトミセス・ロセウス (*Streptomyces roseus*) に属する微生物株が挙げられ、具体例としてアルスロバクター・パセンス (*Arthrobacter pascens*) IF012139株、クリセオモナス・ルテオラ (*Chryseomonas luteola*) JCM3352株、フラビモナス・オリジハビタンス (*Flavimonas oryzihabitans*) JCM2952株、クレブシエラ・プランチコラ (*Klebsiella planticola*) JCM7251株、ノカルディア・ディアファノゾナリア (*Nocardia diaphanozonaria*) JCM3208株、シュードモナス・クロロラフィス (*Pseudomonas chlororaphis*) IF03521株、シュードモナス・オレオボランス (*Pseudomonas oleovorans*) IF013583株、シュードモナス・オキザラチカス (*Pseudomonas oxalaticus*) IF013593株、シュードモナス・タエトロレンス (*Pseudomonas taetrolens*) IF03460株、リゾビウム・メリロチ (*Rhizobium meliloti*) IF014782株、サッカロポリスポラ・ヒルスタ (*Saccharopolyspora hirsuta* subsp. *kobensis*) JCM9109株、ストレプトミセス・ロセウス (*Streptomyces roseus*) IF012818株があげられる。

#### 【0008】

本発明方法に用いられる本微生物は、以下のように培養することによって調製することができる。

本微生物を培養する為の培地組成は特に限定されず、一般微生物における通常の培養に使用される炭素源や窒素源、有機ないし無機塩等を適宜含む各種の培地を用いることができる。例えば、炭素源としては、グルコース、フルクトース、シュクロース、デキストリン等の糖類、グリセロール、ソルビトール等の糖アルコール、フマル酸、クエン酸、ピルビン酸等の有機酸等があげられる。これら炭素源の培地への添加量は通常0.1～10% (w/v) 程度とするとよい。窒素源としては、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機酸のアンモニウム塩、フマル酸アンモニウム、クエン酸アンモニウム等の有機酸のアンモニウム塩、肉エキス、酵母エキス、麦芽エキス、大豆粉、コーンステイプリカー、綿実粉、乾燥酵母、カゼイン加水分解物等の天然有機窒素源またはアミノ酸等があげられる。このうち天然有機窒素源、アミノ酸などは、多くの場合、炭素源及び窒素源としても機能する。窒素源の添加量は通常0.1～10%



(w/v) 程度とするとよい。また無機塩類としては、リン酸一カリウム、リン酸二カリウム、リン酸一ナトリウム、リン酸二ナトリウム等のリン酸塩、塩化カリウム、塩化ナトリウム、塩化コバルト 6 水和物等の塩化物塩、硫酸マグネシウム、硫酸第一鉄 7 水和物、硫酸亜鉛 7 水和物、硫酸マンガン 3 水和物等の硫酸金属塩等をあげることができ、その添加量は通常 0.0001% (w/v) ~ 1% (w/v) 程度とするとよい。

## 【0009】

前記本微生物の培養は、一般微生物における通常の方法に準じて行い、固体培養、液体培養（試験管振盪式培養、往復式振盪培養、ジャーファーマンター (Jar Fermenter) 培養、培養タンク等のいずれも可能である。特に、ジャーファーマンターを用いる場合、ジャーファーマンター内に無菌空気を導入する必要がある、通常、培養液量の約 0.1 ~ 約 2 倍/分の通気条件を用いる。培養温度は、微生物が生育する範囲で適宜変更できるが、例えば、約 15℃ ~ 約 40℃ の範囲の培養温度、約 6 ~ 約 8 の培地 pH で培養することが好ましい。培養時間は、種々の培養条件によって異なるが、通常約 1 ~ 約 10 日間程度が望ましい。

## 【0010】

前述のようにして培養される本微生物は、例えば、微生物の培養物、微生物の培養物から遠心分離によって得られる微生物菌体、または菌体の処理物などの種々の形態で本発明方法に用いることができる。ここで処理物としては、例えば、凍結乾燥菌体、アセトン乾燥菌体、菌体摩砕物、菌体の自己消化物、菌体の超音波処理物、菌体抽出物、菌体のアルカリ処理物等をあげることができ、さらに、これら種々の形態の本微生物を、例えば、シリカゲルやセラミックス等の無機担体、セルロース、イオン交換樹脂等へ吸着させる担体結合法や、ポリアクリルアミド、含硫多糖ゲル（例えばカラギーナンゲル）、アルギン酸ゲル、寒天ゲル等の高分子の網目構造の中に閉じ込める包括法などの公知の方法に準じて固定化した固定化物として用いることもできる。尚、本微生物は、例えば、ラセミ体の p-クロロフェニルアラニン光学活性 p-クロロフェニルアラニンに変換する能力を指標にして選抜することができる。この際、得られる光学活性体の立体配置によって、目的とする本アミノ酸 (1) の L 体、D 体いずれかの光学異性体製造

用の本微生物とすることができる。

【0011】

本アミノ酸(1)の置換基Rは、C1-12アルキル基、置換されたC1-12アルキル基、C4-8シクロアルキル基、置換されたC4-8シクロアルキル基、C6-14アリール基または置換されたC6-14アリール基を表す。ここでC1-12アルキル基としては、例えばメチル基、エチル基、プロピル基、1-メチルエチル基、2-メチルプロピル基、1-メチルプロピル基、1,1-ジメチルエチル基、ペンチル基、ヘキシル基、ヘプチル基、オクチル基、ノニル基、デシル基、ウンデシル基、ドデシル基等を挙げることができ、C4-8シクロアルキル基としては、例えばシクロブチル基、シクロペンチル基、シクロヘキシル基、シクロヘプチル基、シクロオクチル基等を挙げることができ、C6-14アリール基としては、例えばフェニル基、ナフチル基を挙げることができる。

置換基Rの置換されたC1-12アルキル基における置換されたとは、該アルキル基の水素原子の1個以上、通常は1~5個が、例えばC4-8シクロアルキル基；C1-3アルキル基、C1-3アルコキシ基、アミノ基、シアノ基、水酸基およびハロゲン原子からなる群より選ばれる1種以上で置換されたC4-8シクロアルキル基；C1-2アルコキシ基；C1-2アルキルチオ基；メチレンジオキシ基；水酸基；シアノ基；カルボキシ基；C2-5アルキルオキシカルボニル基；アミノ基；モノまたはジ(C1-5)アルキルアミノ基；アミノカルボニル基；グアニジノ基；3-インドリル基；メルカプト基；フェニル基；C1-3アルキル基、C1-3アルコキシ基、アミノ基、シアノ基、ベンジルオキシ基、水酸基およびハロゲン原子から選ばれる1種以上で置換されたフェニル基；フェノキシ基；C1-3アルキル基、C1-3アルコキシ基、アミノ基、シアノ基、ベンジルオキシ基、水酸基およびハロゲン原子から選ばれる1種以上で置換されたフェノキシ基；ナフチル基；C1-3アルキル基、C1-3アルコキシ基、アミノ基、シアノ基、ベンジルオキシ基、水酸基およびハロゲン原子から選ばれる1種以上で置換されたナフチル基；ベンジルオキシ基；およびハロゲン原子からなる群より選ばれる同一または相異なる置換基で置換されていることを意味する。該置換基の好ましい例としては、メチル基、エチル基、シクロヘキシル基、

メトキシ基、エトキシ基、メチルチオ基、エチルチオ基、アミノカルボニル基、グアニジノ基、3-インドリル基、メルカプト基、メチレンジオキシ基、水酸基、シアノ基、アミノ基、カルボキシ基、フェニル基、ベンジルオキシ基、ジベンジルオキシフェニル基、メチレンジオキシフェニル基、フッ素原子、塩素原子および臭素原子を挙げることができる

【0012】

置換基Rの置換されたC4-8シクロアルキル基における置換されたとは、該シクロアルキル基の水素原子の1個以上、通常は1~3個が、例えばC1-3アルキル基、C1-3アルコキシ基、アミノ基、シアノ基、水酸基およびハロゲン原子からなる群より選ばれる同一または相異なる置換基で置換されていることを意味する。

【0013】

置換基Rの置換されたC6-14アリール基における置換されたとは、該アリール基の水素原子の1個以上、通常は1~5個が、例えばC1-3アルキル基；C1-2ハロゲン化アルキル基；C1-2アルコキシ基；メチレンジオキシ基；水酸基；シアノ基；カルボキシ基；C2-5アルキルオキシカルボニル基；アミノ基；モノまたはジ（C1-5）アルキルアミノ基；フェニル基；C1-3アルキル基、C1-3アルコキシ基および水酸基から選ばれる1種以上で置換されたフェニル基；フェノキシ基；C1-3アルコキシ基および水酸基から選ばれる1種以上で置換されたフェノキシ基；ベンジルオキシ基；およびハロゲン原子からなる群、好ましくは、メチル基、エチル基、モノクロロメチル基、トリフルオロメチル基、メトキシ基、メチレンジオキシ基、水酸基、シアノ基、アミノ基、カルボキシ基、フェニル基、ベンジルオキシ基、フッ素原子、塩素原子および臭素原子からなる群より選択される同一または相異なる置換基で置換されていることを意味する。

【0014】

置換基Rとして具体的に、C1-12アルキル基または置換されたC1-12アルキル基としては、例えばメチル基、エチル基、プロピル基、ブチル基、1-メチルエチル基、2-メチルプロピル基、1-メチルプロピル基、1,1-ジメ

チルエチル基、3-グアニジノプロピル基、3-インドリルメチル基、ヒドロキシメチル基、1-ヒドロキシエチル基、2-ヒドロキシエチル基、メチルチオエチル基、エチルチオエチル基、4-アミノブチル基、カルボキシメチル基、カルボキシエチル基、アミノカルボニルメチル基、アミノカルボニルエチル基、ベンジル基、p-ヒドロキシフェニルメチル基、p-クロロフェニルメチル基、p-フルオロフェニルメチル基、m-シアノフェニルメチル基及びナフチルメチル基を挙げることができる。

C4-8シクロアルキル基または置換されたC4-8シクロアルキル基としては、例えばシクロヘキシル基、4-クロロシクロヘキシル基等を挙げることができる、C6-14アリール基または置換されたC6-14アリール基としては、例えばフェニル基、p-ヒドロキシフェニル基、p-クロロフェニル基及びナフチル基を挙げることができる。

#### 【0015】

本アミノ酸(1)としてより具体的には、例えば、アラニン、ノルバリン、tert-ロイシン、メチオニン、2-アミノ酪酸、2-アミノアジピン酸、セリン、O-メチルセリン、スレオニン、フェニルグリシン、フェニルアラニン、p-クロロフェニルアラニン、p-フルオロフェニルアラニン、ナフチルグリシン、ナフチルアラニン等をあげることができる。

#### 【0016】

本発明方法において、例えば目的とする本アミノ酸(1)がL体の場合には、本微生物として本アミノ酸(1)のD体をL体に変換する能力を有する微生物が用いられ、原料としては本アミノ酸(1)のD体単独、あるいはD体とL体の混合物が用いられる。目的とする本アミノ酸(1)がD体の場合には、本微生物として本アミノ酸(1)のL体をD体に変換する能力を有する微生物が用いられ、原料として本アミノ酸(1)のL体単独、あるいはD体とL体の混合物が用いられる。原料として本アミノ酸(1)のD体とL体の混合物を用いる場合には、その比率は特に制限ないが、概ね1:1のいわゆるラセミ体を用いることが工業的な生産を考慮すると好ましい。また、例えば、予め他の方法により目的とする異性体比率の比較的高い混合物を調製し、これを用いて本発明方法を実施すること

もできる。

【0017】

本発明方法は通常、リン酸ナトリウム、リン酸カリウム等のリン酸アルカリ金属塩などの無機酸塩、酢酸ナトリウム、酢酸カリウム等の酢酸アルカリ金属塩などの有機酸塩等を含む水性バッファー液中で行われ、本発明方法における反応液中における本アミノ酸(1)の濃度は通常30% (w/v) 程度以下が適しており、好ましくは0.01~20% (w/v) 程度である。本微生物の量は、例えば反応時間や生成する本アミノ酸(1)のL体またはR体の選択性等を考慮して適宜決めることができる。例えば本アミノ酸(1)に対して通常は0.01~200重量倍、好ましくは0.1~50重量倍である。反応温度は通常10~70℃程度が適しており、好ましくは20~60℃程度である。反応液のpHは通常4~12程度が適しており、好ましくは5~11程度である。反応時間は、例えば所望とする異性体比率等により適宜設定することができる。通常は16~120時間程度であり、反応の終点を、例えば液体クロマトグラフィー等により適宜追跡しつつ決めることもできる。

【0018】

さらに界面活性剤、補酵素、金属塩、微量栄養源あるいは有機溶媒等を補助剤として反応液に添加すると、反応時間の短縮や変換率の向上に有効な場合があり、必要に応じてこれらの補助剤を単独又は任意に組み合わせて反応液に添加することもできる。使用し得る界面活性剤として具体的には、例えばドデシル硫酸ナトリウム、ポリエチレングリコールモノ-p-イソオクチルフェニルエーテル又は臭化セチルピリジウム等を挙げることができ、補酵素として具体的には、例えばニコチンアミドアデニンヌクレオチド、ピリドキサルリン酸、コエンザイムA等を挙げることができる。金属塩として具体には、例えばリン酸二水素一カリウム、リン酸一水素二ナトリウム、硫酸マグネシウム7水和物、硫酸第一鉄7水和物、硫酸亜鉛7水和物、硫酸マンガン3水和物、塩化コバルト6水和物等を挙げることができ、微量栄養源として具体的には、例えば酵母エキス等を挙げることができる。また、有機溶媒としては、例えばn-ヘプタン、シクロヘキサン、イソオクタン等のアルカン類、メチル-tert-ブチルエーテル等のエーテル類

、メタノール、イソプロパノール、*n*-オクタノール等のアルコール類、DMSO等のスルホキシド類、アセトン等のケトン類、オキサロ酢酸、ピルビン酸、 $\alpha$ -ケトラク酸等のケト酸類、ピルビン酸ナトリウム等のケト酸類のアルカリ金属塩、ピルビン酸メチル等ケト酸類のアルキルエステル等を挙げることができる。

## 【0019】

かくして生成される本アミノ酸(1)のL体またはD体は、公知の処理方法により、反応液から回収することができる。例えば、反応液から遠心分離により微生物の培養物又はその処理物を分離後、上清液を酸性に調整し、ジエチルエーテルやトルエン等の有機溶媒で抽出・分液して有機層を除き、次いで水層を塩基性として同様な有機溶媒で抽出・分液し水層を除いた後、該溶媒を減圧留去することにより得られ、必要によりクロマトグラフィー等により精製することもできる。

## 【0020】

## 【実施例】

以下、実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

## 実施例1

グリセロール1.0% (w/v)、ポリペプトン(日本製薬製)0.2% (w/v)、肉エキス粉末(極東製薬製)0.3% (w/v)、酵母エキス(Difco社製)0.3% (w/v)、リン酸二カリウム0.1% (w/v)、リン酸一カリウム0.1% (w/v)、硫酸マグネシウム7水和物0.03% (w/v)をそれぞれ含有する滅菌培地(pH7.0)100mlを入れた500mL容坂口フラスコに、予め同じ組成の培地にて培養された *Nocardia diaphanozonaria* JCM3208株の培養液を1mL植菌して、30℃で往復振盪しながら3日間培養した。この培養液から遠心分離(10000×g、10分間)によって菌体を集め、これに10mlの100mMリン酸カリウムバッファー(pH7.0)を加えて再度懸濁し、遠心分離(10000×g、10分間)によって菌体を集め湿菌体を得た。こうして得られた湿菌体を10mlの100mMリン酸カリウムバッファー(pH7.0)に懸濁し、菌体懸濁液とした。50mgのD-パークロロフェ

ニルアラニン、リン酸二水素一カリウム 0.15% (w/v)、リン酸一水素二ナトリウム 0.15% (w/v)、硫酸マグネシウム 7 水和物 0.02% (w/v)、硫酸第一鉄 7 水和物 0.001% (w/v)、硫酸亜鉛 7 水和物 0.001% (w/v)、硫酸マンガン 3 水和物 0.001% (w/v)、塩化コバルト 6 水和物 0.001% (w/v) および酵母エキス 0.0005% (w/v) をそれぞれ含有する水溶液 (pH 7.0) 45 mL に溶解し、前記菌体懸濁液 5 mL を加えて、マグネティックスターラーを用いて 1000 rpm で攪拌回転させながら 30℃ で 74 時間保温した。その後、反応液の一部を取り、遠心分離により菌体を除去した上清液を液体クロマトグラフィーにて分析することにより、光学純度 100% e. e. の L-p-クロロフェニルアラニンが収率 79% で得られていることを確認した。

## 【0021】

## 実施例 2

実施例 1 において、D-p-クロロフェニルアラニンに代えてラセミー p-クロロフェニルアラニンを用い、保温時間を 24 時間とした以外は全く同様にして反応を行った。その後、反応液の一部を取り、遠心分離により菌体を除去した上清液を液体クロマトグラフィーにて分析することにより、光学純度 72% e. e. の L-p-クロロフェニルアラニンが収率 82% で得られていた。

## 【0022】

## 参考例 1

実施例 1 において、D-p-クロロフェニルアラニンに代えて L-p-クロロフェニルアラニンを用いる以外は全く同様にして反応を行った。その後、反応液の一部を取り、遠心分離により菌体を除去した上清液を液体クロマトグラフィーにて分析することにより、D-p-クロロフェニルアラニンが全く生成していないことを確認した。

## 【0023】

## 実施例 3

グリセロール 1.0% (w/v)、ポリペプトン (日本製薬製) 0.2% (w/v)、肉エキス粉末 (極東製薬製) 0.3% (w/v)、酵母エキス (Dif

c o 社製) 0.3% (w/v)、リン酸二カリウム 0.1% (w/v)、リン酸一カリウム 0.1% (w/v)、硫酸マグネシウム 7水和物 0.03% (w/v) をそれぞれ含有する滅菌培地 (pH 7.0) 3 ml を入れた 10 mL 容試験管に、30% (w/v) グリセロール水溶液として -80℃ で凍結保存していた表 1 記載の各微生物菌体を 1 白金耳植菌して、30℃ で往復振盪しながら 2 日間培養した。この培養液の全量から遠心分離 (10000×g、10 分間) によって菌体を集め、3 mL の 100 mM リン酸カリウムバッファー (pH 7.0) を加えて再度懸濁し、遠心分離 (10000×g、10 分間) によって菌体を集め湿菌体を得た。これに、D- p- クロロフェニルアラニン 0.1% (w/v)、リン酸二水素一カリウム 0.15% (w/v)、リン酸一水素二ナトリウム 0.15% (w/v)、硫酸マグネシウム 7水和物 0.02% (w/v)、硫酸第一鉄 7水和物 0.001% (w/v)、硫酸亜鉛 7水和物 0.001% (w/v)、硫酸マンガン 3水和物 0.001% (w/v)、塩化コバルト 6水和物 0.001% (w/v) および酵母エキス 0.0005% (w/v) をそれぞれ含有する水溶液 (pH 7.0) 3 ml を加えて、250 回/分で往復振とうさせながら 30℃ で表 1 記載の時間保温した。結果を表 1 に示す。

【0024】



【表 1】

本微生物	保温時間 (h)	L 体比 (%)	D 体比 (%)
アルスロバクター・パセンス IFO12139	72	64	36
クリセオモナス・ルテオラ JCM3352	72	81	19
フラビモナス・オリジナビタンス JCM2952	72	90	10
クレブシエラ・プランチコラ JCM7251	48	61	39
シュードモナス・クロロラフィス IFO3521	72	94	6
シュードモナス・オレオボランス IFO13583	48	89	11
シュードモナス・オキザラチカス IFO13593	48	75	25
シュードモナス・タエトロレンス IFO3460	72	90	10
リゾビウム・メリロチ IFO14782	48	84	16
サッカロポリスボラ・ヒルスタ JCM9109	72	67	33
ストレプトミセス・ロセウス IFO12818	48	96	4

【0025】

## 参考例 2

実施例 3 において D-p-クロロフェニルアラニンに代えて L-p-クロロフェニルアラニンを用いる以外は全く同様にして反応を行った。結果を表 2 に示す。

【0026】

【表 2】

本微生物	保温時間 (h)	L体比 (%)	D体比 (%)
アルスロバクター・パセンス IFO12139	72	100	0
クリセオモナス・ルテオラ JCM3352	72	100	0
フラビモナス・オリジハビタンス JCM2952	72	100	0
クレブシエラ・プランチコラ JCM7251	48	100	0
シュードモナス・クロロラフィス IFO3521	72	100	0
シュードモナス・オレオボランス IFO13583	48	100	0
シュードモナス・オキザラチカス IFO13593	48	100	0
シュードモナス・タエトロレンス IFO3460	72	100	0
リゾビウム・メリロチ IFO14782	48	100	0
サッカロポリスボラ・ヒルスタ JCM9109	72	100	0
ストレプトミセス・ロセウス IFO12818	48	100	0

## 【0027】

## 実施例 4

表 3 に記載した各ラセミ体アミノ酸 10 mg を、リン酸二水素一カリウム 0.15% (w/v)、リン酸一水素二ナトリウム 0.15% (w/v)、硫酸マグネシウム 7 水和物 0.02% (w/v)、硫酸第一鉄 7 水和物 0.001% (w/v)、硫酸亜鉛 7 水和物 0.001% (w/v)、硫酸マンガン 3 水和物 0.001% (w/v)、塩化コバルト 6 水和物 0.001% (w/v) および酵母エキス 0.0005% (w/v) をそれぞれ含有する水溶液 (pH 7.0) 9 ml に溶解させた。これらのラセミアミノ酸を含む水溶液 2.7 ml に、実施例 1 と同様にして調製した菌体懸濁液 0.3 ml を加えて、250 回/分で往復振とうさせながら 30℃ で表 3 記載の時間保温した。結果を表 3 に示す。

## 【0028】

【表 3】

基質アミノ酸 (ラセミ体)	保温時間 (h)	L 体比 (%)	D 体比 (%)
ノルバリン	48	96	4
フェニルグリシン	48	100	0
メチオニン	72	69	31
2-アミノ酪酸	72	70	30

【0029】

## 実施例 5

表 4 に記載した各 D 体アミノ酸 10 mg を、リン酸二水素一カリウム 0.15% (w/v)、リン酸一水素二ナトリウム 0.15% (w/v)、硫酸マグネシウム 7 水和物 0.02% (w/v)、硫酸第一鉄 7 水和物 0.001% (w/v)、硫酸亜鉛 7 水和物 0.001% (w/v)、硫酸マンガン 3 水和物 0.001% (w/v)、塩化コバルト 6 水和物 0.001% (w/v) および酵母エキス 0.0005% (w/v) をそれぞれ含有する水溶液 (pH 7.0) 9 ml に溶解させた。これらの各 D 体アミノ酸を含有する水溶液 2.7 ml に、実施例 1 と同様にして調製した菌体懸濁液 0.3 ml を加えて、250 回/分で往復振とうさせながら 30℃ で表 4 記載の時間保温した。結果を表 4 に示す。

【0030】

【表 4】

基質アミノ酸 (D-体)	保温時間 (h)	L 体比 (%)	D 体比 (%)
ノルバリン	48	99	1
フェニルグリシン	70	98	2
メチオニン	70	39	61
tert-ロイシン	47	7	93
2-アミノ酪酸	70	62	38
ナフチルアラニン	96	56	44

【0031】

## 参考例 3

実施例 5 において各 D 体アミノ酸に代えて L 体アミノ酸を用いる以外は全く同様にして反応を行った。結果を表 5 に示す。

【0032】

【表 5】

基質アミノ酸 (L-体)	反応時間 (h)	L 体比 (%)	D 体比 (%)
ノルバリン	72	100	0
フェニルグリシン	72	100	0
メチオニン	48	100	0
tert-ロイシン	72	100	0
$\alpha$ -アミノ酪酸	48	100	0
ナフチルアラニン	96	100	0

【0033】

## 【発明の効果】

本発明によれば、医薬中間体、飼料添加物あるいは食品添加物等として有用な光学活性アミノ酸類を微生物を用いて効率的に製造し得る。

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 微生物を用いるより効率的な光学活性アミノ酸類の製造方法を提供する。

【解決手段】 明細書中に規定する一般式（１）で示されるアミノ酸のＤ体に、アミノ酸（１）のＤ体をＬ体に変換する能力を有する微生物を作用させることを特徴とする本アミノ酸（１）のＬ体の製造方法、及びアミノ酸（１）のＬ体に、アミノ酸（１）のＬ体をＤ体に変換する能力を有する微生物を作用させることを特徴とするアミノ酸（１）のＤ体の製造方法。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000002093]

1. 変更年月日 1990年 8月28日

[変更理由] 新規登録

住 所 大阪府大阪市中央区北浜4丁目5番33号

氏 名 住友化学工業株式会社